

# 論文内容の要旨

申請者氏名 小牧 伸一郎

植物の形態形成には、細胞の分裂と伸長が重要な役割を果たす。この2つの現象に深く関わっているのが微小管である。植物は細胞周期の各段階で特有の微小管構造物を作り出すことが知られており、微小管のプラス端が正確に局在することでその構築や安定性に寄与することが示唆されている。微小管のプラス端の制御機構はいまだ不明な点が多いが、その一端を担っていると考えられているのが End Binding 1 (EB1)である。EB1 は酵母から動植物にいたる幅広い生物に高度に保存され、他のタンパク質の足場として機能的複合体を形成することで、微小管の配向や動態に重要な役割を果たすことが多くの実験より示されている。アラビドプシスには3つのEB1 ホモログ(EB1a, EB1b, EB1c)が存在する。これらEB1は2種類に分類できる。EB1aとEB1bは他の生物のEB1と非常によく似た一般的な構造を持ち、C末に特有の配列を持つEB1cは植物にのみ保存されているEB1 サブタイプに属する。本研究ではこれら2種類のEB1の機能の違いを比較することで植物の微小管構造の制御機構の一端を明らかにすることを試みた。まず、*in vitro*でのアラビドプシスEB1の機能を調べたところすべてのEB1に微小管重合促進活性があることが示され、中でもEB1cが最も高い重合促進活性を持つことがわかった。次に*in vivo*でのEB1の機能を比較するために、各EB1変異体植物の微小管構造を観察した。その結果、*eb1c*変異体でのみ配向や形に異常を示す紡錘体が見られた。この表現形は微小管重合阻害剤であるオリザリンを処理することでより高頻度に観察された。またオリザリン処理された*eb1c*変異体は微小管構造の乱れから根の細胞の分裂異常を引き起こし、伸長も阻害された。つまり、EB1cは紡錘体の2極性の維持に必要であると考えられた。一方、*eb1a eb1b*の2重変異体では根の伸長方向が野生株に比べ左にねじれたように伸長することがわかり、その原因は表層微小管の配向にあることを突き止めた。つまりEB1a,bは表層微小管の配向制御に関わることが示唆された。次に各EB1の発現領域および細胞内局在性を調べるためにGFPを融合し、アラビドプシス植物体に導入した。その結果、EB1aおよびEB1bは植物体全体で発現しているのに対し、EB1cは分裂領域において特に強い発現を示すことがわかった。また間期細胞においてEB1aおよびEB1bは表層微小管のプラス端に局在したがEB1cは核内に局在することがわかった。また核に局在できないEB1cは*eb1c*変異体の表現形を部分的にしか相補できないことからEB1cが正常に機能するためには間期に核内に局在する必要があることがわかった。

以上の結果よりアラビドプシスでは2種類の機能的なEB1が存在し、このうち植物特有のEB1cは微小管の重合を促進することで紡錘体の2極性の維持に関わることが明らかとなった。また他の生物のEB1とは異なりEB1cは間期に核内に局在することで本来の機能を発揮することがわかった。一方、EB1a,bは表層微小管の安定性を高めることでその配向決定に関与することが明らかとなった。これらの結果は植物が機能的に異なるEB1を使い分けることで微小管構造の維持や、細胞分裂の極性を制御していることを示唆する。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 小牧 伸一郎

微小管は真核生物に高度に保存された細胞骨格であり、その高次構造、動態、他の細胞構造物との相互作用を変化させることにより、細胞分裂、細胞極性形成、オルガネラ移動など多様な細胞機能に重要な役割を果たしている。微小管機能を制御するタンパク質のある種のグループは酵母、動物、植物で保存されており、同様な微小管制御機能を持つものと想像できる。このような生物種間で広く存在する微小管制御タンパク質のひとつに、End Binding 1 (EB1)がある。最近の酵母や動物細胞を用いた研究により、EB1は単独で微小管プラス端を認識して、プラス端の構造と動態を制御し、さらにそこに集積する多様な微小管プラス端集積因子との相互作用の核となることが明らかになってきた。一方、植物においては酵母や動物で見出されている微小管プラス端集積因子の多くが保存されておらず、微小管プラス端の制御機構は不明である。また、アラビドプシスの EB1 遺伝子の発現抑制変異株では微弱な表現形が報告されており、その細胞機能の解明は他の生物との比較の観点からも非常に興味深い。

本論文では最初に、モデル植物シロイヌナズナに存在する 3 種の EB1 (EB1a, EB1b, EB1c) について全長と各ドメイン部分長のそれぞれ組換えタンパク質を調整し、*in vitro* で微小管結合能、微小管重合活性促進作用、二量体形成能を解析した。その概要は酵母や動物の EB1 の生化学的性質と類似していたが、EB1c が自己活性抑制能を持たず、EB1a や EB1b とヘテロ二量体を形成しないという点で際立った特徴を有していた。次に、GFP 融合タンパク質を利用した詳細な細胞内局在性と動態解析を行ったところ、間期細胞では EB1a と EB1b は表層微小管のプラス端に局在するのに対し、EB1c は C 末端の核移行シグナルにより核内に集積することが明らかとなった。さらに、アラビドプシス遺伝子破壊変異株では EB1a と EB1b の機能欠失は表層微小管の微弱な表現形を与えるが、EB1c の機能欠失では細胞分裂時の紡錘体微小管の形成と配置が異常になるという対照的な表現形が見られた。タバコ培養細胞において EB1c を発現抑制すると、染色体分配の異常が見られたことから、EB1c は主に紡錘体微小管の正常な機能に重要であることが判明した。さらに、変異型 EB1 タンパク質を用いたアラビドプシス EB1c 変異株表現形の相補試験により、植物特異的な EB1c サブファミリーが間期の核内に活性化型で局在することにより細胞分裂前期に効果的に機能するように進化してきたと推察された。EB1 はこれまでに微小管プラス端マーカーとして植物の細胞生物学研究に用いられてきたが、その機能の詳細が明らかとなったのは本研究が始めてである。

以上のように、本論文は植物の細胞分裂における微小管機能を生化学、分子遺伝学、分子生物学、細胞生物学を用いて研究したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。